

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 707 091

(21) N° d'enregistrement national :

93 08015

(51) Int Cl^e : C 12 N 15/86 , 15/90 , 5/10

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 30.06.93.

(71) Demandeur(s) : COHEN-HAGUENAUER Odile — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 06.01.95 Bulletin 95/01.

(72) Inventeur(s) : Cohen-Haguenauer Odile et Heard
Jean-Michel.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(74) Mandataire : Gutmann Ernest - Plasseraud Yves.

(54) Vecteur rétroviral pour le transfert et l'expression de gènes dans des cellules eucaryotes.

(57) L'invention concerne un vecteur recombinant pour le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert d'une séquence de nucléotides exogène caractérisé en ce qu'il comprend toute séquence contenue dans le fragment Clal-PvuII comprenant les nucléotides 7702 et 1527 de la séquence donnée à la figure 1 et comprenant l'enchaînement LTR compris entre les nucléotides 7842 et 144, le site PBS débutant au nucléotide 145, la séquence d'encapsulation comprise dans l'enchaînement de 250 nucléotides suivant la fin de la séquence LTR, ladite séquence étant capable de contrôler le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert de la séquence exogène, quelle que soit son orientation transcriptionnelle par rapport à l'orientation ou transcriptionnelle du virus.

Elle est relative à l'utilisation de ce vecteur pour le transfert et/ou le clonage et/ou l'expression de gènes notamment dans le cadre de la thérapie génique.

FR 2 707 091 - A1



VECTEUR RETROVIRAL POUR LE TRANSFERT ET L'EXPRESSION DE GENES DANS DES CELLULES EUCHARYOTES.

L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs rétroviraux, notamment pour le transfert et l'expression de gènes dans des cellules eucaryotes. L'invention propose à cet égard des vecteurs particulièrement appropriés pour l'utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques.

L'évolution rapide de la génétique moléculaire a permis l'identification d'un nombre croissant d'anomalies moléculaires responsables de maladies humaines. Au sein de l'unité fonctionnelle que constitue un gène, se juxtaposent des régions responsables de l'expression d'un signal biologique et de sa régulation. Chacune de ces régions est susceptible d'être le siège de modifications pathologiques conduisant à une anomalie de synthèse quantitative ou qualitative. La détection de ces anomalies en autorise un dépistage mais l'objectif prioritaire reste d'ordre thérapeutique.

Le transfert de gènes à visée thérapeutique ou "thérapie génique" somatique consiste à insérer un gène "réparateur" dans les cellules somatiques d'un organisme constitué, pour pallier au dysfonctionnement d'un gène endogène ; voire y ajouter une fonction nouvelle dans un but thérapeutique. Le changement génétique résultant est susceptible de se transmettre aux cellules filles de la cellule manipulée, mais il ne sera pas héréditaire. La contrepartie normale de séquences d'ADN altérées se voit ainsi transformée en médicament.

Le domaine de la thérapie génique est aujourd'hui en pleine évolution et conjugue des essais cliniques (pour des effectifs de patients encore très limités)

avec des travaux de recherche des plus fondamentaux, tels que les modes de régulation de l'expression génique ou la vectorisation des séquences thérapeutiques d'acides nucléiques. Les vecteurs actuellement utilisés sont dérivés soit de virus inactivés, tels que les rétrovirus ou les adénovirus, soit de complexes macromoléculaires. Les rétrovirus s'adressent plus volontiers à un tissu cible comprenant un contingent de cellules souches susceptibles d'être manipulées ex vivo ; par contre, lorsque le tissu cible est constitué de cellules en différenciation terminale, ou bien intriqué dans un organe dont les contraintes architecturales ont des conséquences fonctionnelles majeures, comme le poumon, le transfert de gènes doit s'opérer in vivo, par exemple au moyen d'adénovirus. La thérapie génique trouve ses applications dans des pathologies aussi diverses que les maladies héréditaires dues à l'altération d'un seul gène, comme la myopathie de Duchenne, les maladies lysosomiales, la mucoviscidose ou des maladies acquises telles que le sida, les cancers, la maladie thrombo-embolique ou des maladies neurologiques dégénératives.

Néanmoins, si les applications potentielles du transfert de gènes sont extraordinairement larges, les développements thérapeutiques de cette approche et sa pertinence se heurtent encore à des difficultés technologiques.

Le développement de vecteurs rétroviraux plus efficaces que les outils existant constitue à cet égard un objectif prioritaire. En effet, les vecteurs rétroviraux ont fait la preuve de leur efficacité dans des systèmes où les cellules cibles du transfert sont l'objet de mitoses et comportent idéalement un contingent de cellules souches ; mais les limitations sont essentiellement liées à une infectivité

insuffisante des virus utilisés et/ou un niveau de transcription trop modeste.

L'invention a pour but de proposer des vecteurs plus performants que ceux existants, lesquels sont actuellement pour la plupart dérivés du squelette du virus de la leucémie murine de Moloney.

L'invention repose sur des travaux réalisés à partir d'une souche particulièrement virulente du virus de Friend. L'isolat I-5 du virus écotope de la leucémie murine de Friend a été obtenu à partir de cultures de moëlle à long terme infectées par le complexe viral inducteur de polyglobulies du virus de Friend (FV-P) (Mathieu-Mahui et al., 1982). La souche FB29 du F-MuLV dérivée de l'isolat I-5 (Sitbon et al, 1986) est responsable d'effets cytolytiques et leucémogènes sur les cellules érythroïdes, conduisant à une anémie hémolytique précoce et sévère suivie d'une érythroleucémie tardive chez les souris susceptibles, innoculées à la naissance. Les régions responsables de l'érythroleucémie ont été localisées au niveau de la région U3 du LTR viral (Sitbon et al, 1986 ; Sitbon et al, 1991). Le déterminant principal de l'anémie hémolytique semble dépendre de séquences d'enveloppe spécifiques de la souche FB29 ; la sévérité pouvant en être influencée par trois régions distinctes, dont un segment structural de l'enveloppe, des séquences activatrices de la transcription localisées dans la région U3, et enfin, des séquences des régions U5-gag-pol (Sitbon et al., 1990).

Les inventeurs se sont intéressés aux caractéristiques particulières de cette souche et l'ont utilisée pour définir des vecteurs rétroviraux.

L'invention a pour objet un vecteur recombinant pour le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert d'une séquence de nucléotides exogène caractérisé en ce

qu'il comprend toute séquence contenue dans le fragment ClaI-PvuII comprenant les nucléotides 7702 et 1527 de la séquence donnée à la figure 1 et comprenant l'enchaînement LTR compris entre les nucléotides 7842 et 144, le site PBS débutant au nucléotide 145, la séquence d'encapsidation comprise dans l'enchaînement de 250 nucléotides suivant la fin de la séquence LTR, ladite séquence étant capable de contrôler le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert de la séquence exogène.

Avantageusement le contrôle du clonage, de l'expression ou du transfert de la séquence exogène est réalisé selon l'invention, quelle que soit l'orientation transcriptionnelle de cette séquence par rapport à l'orientation transcriptionnelle du virus.

Une séquence de nucléotides exogène selon l'invention, est une séquence de nucléotides qui n'est pas naturellement contenue dans le matériel génétique constituant le vecteur, et en particulier dans les séquences nécessaires au contrôle de l'expression du clonage ou du transfert. Il peut s'agir d'une séquence naturelle ou synthétique, notamment d'une séquence hybride.

Par l'expression "transfert d'une séquence de nucléotides exogène", on entend l'incorporation d'une séquence portée par le vecteur, dans le génome d'une cellule transformée par ce vecteur. Un tel transfert peut être réalisé par recombinaison, en particulier par recombinaison homologue.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la séquence exogène et la séquence contenue dans le fragment ClaI-PvuII ou ce fragment selon la description ci-dessus, sont insérés dans un plasmide, par exemple dans le plasmide Puc19, le plasmide Puc18, ou tout autre plasmide approprié.

De préférence, le vecteur recombinant comprend en outre une partie de la séquence gag située entre les nucléotides 619 et 2245 de la séquence de la figure 5, en particulier la séquence comprise entre les nucléotides 619 et 1527 de la séquence de la figure 1.

La présence d'un fragment ou de la totalité de la séquence gag peut contribuer à la stabilisation du vecteur obtenu et le cas échéant permet de diminuer le risque de recombinaison à l'intérieur de ce vecteur. La séquence gag code pour une nucléoprotéine du virus de Friend.

Un vecteur particulièrement préféré dans le cadre de la réalisation de l'invention est le vecteur comprenant le fragment ClaI-PvuII comprenant les nucléotides 7702 à 1527 de la séquence représentée à la figure 1.

Un vecteur ainsi construit contenant une unique séquence LTR peut être en particulier mis en oeuvre dans le cadre du transfert de gènes ex vivo ou in vivo, ledit gène étant représenté par la séquence de nucléotides exogène.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le vecteur recombinant est caractérisé en ce qu'il comprend en outre toute séquence contenue dans le fragment BamHI-BamHI comprenant les nucléotides 7702 à 310 de la séquence représentée à la figure 1, et comprenant l'enchaînement LTR compris entre les nucléotides 7842 et 144, le site PBS débutant au nucléotide 145, la séquence d'encapsidation comprise dans l'enchaînement de 250 nucléotides suivant la fin de la séquence LTR, ladite séquence étant capable de contrôler le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert de la séquence exogène, quelle que soit son orientation transcriptionnelle par rapport à l'orientation transcriptionnelle du virus.

Un tel vecteur contient donc deux séquences LTR, ayant la même origine virale.

Ces séquences LTR peuvent être séparées sur le vecteur par la présence de la séquence gag dont il a été question ci-dessus et/ou par la séquence de nucléotides exogène que l'on cherche à transférer, cloner ou exprimer.

Selon un mode de réalisation intéressant de l'invention, le vecteur recombinant est caractérisé en ce qu'il comprend la totalité du fragment BamHI-BamHI, comprenant les nucléotides 7702 à 310 de la séquence représentée à la figure 1.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant tel que la séquence contenue dans le fragment ClaI-PvuII et/ou ce fragment, et/ou la séquence contenue dans le fragment BamHI-BamHI et/ou ce fragment est remplacée soit par une séquence hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence correspondante des susdits fragments, soit par une séquence ayant une homologie d'au moins 95% en nucléotides avec la séquence correspondante des susdits fragments ou d'au moins 85% s'agissant de la séquence U3.

L'hybridation est réalisée dans les mêmes milieux d'hybridation que ceux décrits à la partie expérimentale en ajoutant toutefois, deux rinçages pendant 10 min. à 65°C dans un milieu SSC 1x, SDS 0,1 ainsi que 2 rinçages pendant 10 min. à 65°C dans un milieu SSC 0,1x, SDS 0,1.

Le cas échéant, l'une des deux séquences LTR définies précédemment, à partir de la séquence du virus F-MuLV (souche FB29 du virus de Friend) peut être remplacée par une séquence LTR provenant d'un autre virus, par exemple du virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MuLV).

De même le vecteur recombinant de l'invention peut également contenir d'autres séquences rétrovirales que celles qui ont été décrites ci-dessus, soit issues du même virus F-MuLV dont la séquence est donnée à la figure 5, soit issues d'un autre virus.

L'invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins un adaptateur multiple présentant des sites de restriction uniques par rapport aux sites contenus dans le vecteur.

Un tel adaptateur, de préférence à sites multiples (polylinker) a pour but de permettre notamment l'insertion d'une ou plusieurs séquences exogènes dont on recherche le transfert, le clonage ou l'expression.

Un vecteur particulièrement intéressant est le vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide FOCH29 déposé sous la dénomination pFOCH29-SCS1 dans une souche de E.coli SCS1 à la C.N.C.M. le 30 Juin 1993 sous le n°I-1326.

La souche E.coli SCS1 est commercialisée par la société STRATAGENE Corp.

Un vecteur de l'invention peut également comprendre un gène ou une partie d'un gène marqueur comme par exemple le gène de résistance à la néomycine. La présence d'un gène marqueur facilite notamment la détection de la présence du vecteur dans des cellules recombinantes.

L'invention a également pour objet un vecteur recombinant répondant aux définitions précédentes, dans lequel la région U3 du LTR est déletée au moins en partie, de façon telle que le promoteur et/ou l'activateur contenu(s) dans U3 est (sont) au moins en partie inactivé(s) ou modifié(s).

De même la séquence U5, voire le cas échéant la séquence R, peut être déletée au moins en partie.

Cette délétion peut être réalisée au niveau d'un unique enchaînement LTR présent dans le vecteur ou éventuellement au niveau de chaque séquence LTR de ce vecteur.

Elle conduit cependant le plus souvent à une diminution du titre en particules virales.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides exogène est sous le contrôle d'un promoteur exogène.

Par "promoteur exogène", on entend un promoteur qui n'est pas naturellement présent dans le vecteur. Un tel promoteur peut être le promoteur naturel de la séquence exogène. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur inductible.

Un vecteur recombinant défini précédemment est de préférence introduit par exemple par transfection ou électroporation, dans une lignée d'encapsidation. Cette transfection permet la constitution de particules virales, propres à la réalisation de recombinaisons par transduction dans des cellules cible en vue du clonage, du transfert ou de l'expression de la séquence de nucléotides exogène contenue dans le vecteur.

Ainsi, un vecteur particulièrement intéressant peut être transfété dans une lignée psi-CRIP.

On peut également avoir recours à la lignée d'encapsidation psi-CRE ou à toute autre lignée dès lors qu'elle ne conduit pas à des recombinaisons susceptibles de donner lieu à la production de particules virales de type sauvage à partir de l'ADN proviral contenu dans le vecteur.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le vecteur recombinant peut être introduit dans des liposomes ou dans un complexe macromoléculaire (Monsigny M. et al M/S 1993).

Le vecteur FMuMV peut être utilisé pour réaliser de telles lignées d'encapsidation, selon la technique illustrée dans McLachlin JR et al, 1990. Une telle lignée peut être construite à partir des séquences des gènes gag, env et pol, la séquence d'encapsidation étant déletée et une au moins des séquences gag, pol ou env comportant une mutation ponctuelle qui n'altère pas la protéine résultante.

Les vecteurs de l'invention peuvent contenir une ou plusieurs séquences exogènes. Ces séquences peuvent être insérées en dehors des fragment ClaI-PvuII ou BamHI-BamHI comme on l'a vu plus haut, ou au contraire peuvent être insérées au sein de ces fragments et en particulier dans leur séquence LTR.

Ces vecteurs peuvent aussi contenir des éléments de ciblage cellulaire pour orienter l'intégration du vecteur dans des cellules déterminées.

Les applications de ce vecteur peuvent être de nature très diverses et en particulier ces vecteurs peuvent être utilisés pour le clonage, l'expression et/ou le transfert de séquences de nucléotides ayant un intérêt thérapeutique.

Ainsi on peut utiliser les vecteurs de l'invention pour le transfert dans des cellules par exemple des cellules somatiques, de gènes à visée thérapeutique quelle(s) que soi(en)t la ou les maladie(s) ou pathologie(s) concernée(s).

Les séquences d'intérêt thérapeutique dont il est question ici sont par exemple des séquences correspondant à l'équivalent normal d'un gène non fonctionnel dans le cas d'une pathologie donnée, ou encore une séquence antisens ou un mutant négatif dominant d'un gène donné ou une séquence codant pour un inhibiteur fonctionnel d'un gène.

Le transfert peut être réalisé par transduction dans des cellules, tissus, organes ou organismes.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence de nucléotides exogène code pour un antigène ou un déterminant antigénique.

Un vecteur contenant un tel déterminant antigénique pourra être utilisé à titre de vaccin permanent ou transitoire ou le cas échéant dans le cadre d'un protocole thérapeutique, par exemple pour susciter une réponse immunitaire.

A titre d'exemple, des séquences des antigènes des rétrovirus HIV peuvent être incorporées dans le vecteur de l'invention.

La séquence de nucléotides exogène dont il est question précédemment peut être une séquence d'ADN génomique ou une séquence d'ADNc ou encore une séquence d'ARN.

De même, cette séquence peut être naturelle ou synthétique.

L'invention a également pour objet une cellule recombinante procaryote ou eucaryote caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un vecteur recombinant de l'invention.

Une telle cellule est avantageusement une cellule de mammifère, en particulier une cellule humaine.

De même il s'agit soit d'une cellule totalement différenciée ou d'une cellule de type précurseur. Par exemple le vecteur de l'invention est particulièrement approprié pour la modification de cellules hématopoïétiques et également de précurseurs de cellules hématopoïétiques.

Par ailleurs, des cellules nerveuses, neuronales ou gliales, peuvent également être modifiées par le vecteur de l'invention.

Le vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être mis en oeuvre pour modifier des fibroblastes, des cellules cutanées, des cellules hépatiques ou des cellules musculaires.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et les figures qui suivent.

Figure 1 : Séquence de l'ADN viral utilisé pour la réalisation du vecteur FOCH29.

Figure 2 : Carte de restriction du vecteur FOCH29.

Côtes Seq "FB29"

Cla --> U3 140 (7845-7702)

U3 --> R 410 (8255-7845)

R --> CBS 145 (0-145)

PvuII --> BamHI 208

PvuII --> PvuII 1098

pUC628 MT

PvuIIMT --> PvuII 1669

pUC306

BsmAI --> 55/150/765/1766/2531/2684

Figure 3 : Carte de restriction du vecteur FOCH29-Neo. Le gène néo a été cloné dans le site accepteur. Les enzymes utilisables dans le polylinker sont Xba, Sal, SphI.

Coupures: - BglII 2070

5300

- Bam 1392

1500

4456

- Sal/BglII 300

2070

5000

Figure 4 : Carte de restriction du plasmide pUC19.

Figure 5 : Séquence du FMuLV.

Exemples

MATERIEL ET METHODES

1- Source du matériel génomique viral

L'ADN génomique du provirus a été cloné dans pBR322 (Sitbon et al., 1986). Après remplacement du site Cla I en 7702 de la séquence du virus par un site EcoRI, le fragment EcoRI- PvuII de 2110 paires de bases (pb) contenant l'intégralité du Long Terminal Repeat viral (LTR) a été sous-cloné aux sites EcoRI et SmaI du polylinker (adaptateur multiple) de pUC19.

2- Construction du vecteur rétro-viral FOCH29

Le site HindIII du polylinker de pUC19 contenant le fragment EcoRI-PvuII a été remplacé par un site BglIII, après ouverture par HindIII, remplissage par le fragment long de l'ADN polymérase d'E.Coli (fragment Klenow) et ligation avec un adaptateur BglII ne recréant pas le site HindIII ; le site BglII a été introduit pour recevoir un fragment BamHI-BamHI de 865pb contenant un second exemplaire du LTR natif du virus de Friend destiné à constituer le LTR d'aval (ou 3'LTR). Ce fragment BamHI-BamHI a été isolé en remplaçant le site EcoRI de pUC19 par un site BamHI d'amont au moyen d'un adaptateur (linker) ne recréant pas le site EcoRI après remplissage des extrémités par le fragment Klenow de l'ADN polymérase ; le site BamHI d'aval est endogène à la séquence virale.

Ce fragment a donc été introduit par ligation avec l'armature de base (pUC19) dont l'ouverture par BglIII

permettait de ménager des extrémités cohésives avec les extrémités générées par BamHI. Le plasmide résultant est appelé pFOCH29.

3- Introduction d'un gène marqueur

Le fragment d'ADNC BglIII-BamHI (1500 pb) du gène de résistance à la Néomycine dérivé du rétrotransposon Tn5 (NéoR) a été introduit entre les deux LTRs viraux après ligation des trois fragments : pUC19-5'LTR BglIII, NéoR BglIII-BamHI et 3'LTR BamHI-BamHI. Le plasmide résultant est appelé pFOCH29-Néo.

4- Transfection de lignées d'encapsulation Psi-CRIP et infection de fibroblastes

Le plasmide pFOCH29-Néo a été introduit dans la lignée d'encapsulation amphotrope psi-CRIP décrite par Danos et al. (1988) par transfection utilisant la précipitation au phosphate de calcium selon la procédure standard, sans ADN carrier ; 10 microgrammes de plasmide ont été déposés sur une boîte de culture de 35mm de diamètre où $5 \cdot 10^4$ cellules ont été plantées la veille.

Les cellules psi-Crip ont été cultivées en milieu de Dulbecco modifié Eagle (DMEM, Gibco-BRL) additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (HyClone). Deux jours après la transfection les cellules ont été trypsinées, diluées au 1/20 ème et mises sous sélection, en présence de Généticiné à la concentration finale de 1 milligramme (mg) par Millilitre (ml) de milieu de culture. Les colonies apparues après 12 jours ont été prélevées et réimplantées sur des boîtes de culture de 24 trous, à raison d'un clone par trou.

Le surnageant de culture de cellules d'un trou parvenu à confluence a été prélevé, filtré sur 0,45 µm

pour éliminer les cellules en suspension et utilisé pour infecter des fibroblastes murins (NIH3T3) plantés de façon identique sur des boîtes de culture de 24 puits, en présence de polybrène à la concentration de 8 µg/ml. Les NIH3T3 ont été cultivées en DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF). L'intégration virale a été analysée par PCR sur un lysat de NIH3T3 parvenues à confluence.

5- Réaction en chaîne de la Polymérase (Polymerase Chain Reaction ou PCR)

Le surnageant du lysat des NIH3T3 confluentes sur un puits de boîte de culture de 24 puits a été recueilli dans 100 µl dont 10 µl ont été utilisés dans la réaction de PCR, qui est pratiquée dans le tampon suivant : tampon de PCR 10X standard incluant 25mM de MgCl₂ (Perkin-Elmer/Roche MS) ; 100 nanogrammes (ng) de chaque amorce ; 2µl de dNTPs 10mM (mélange équimolaire de chaque dNTP à la concentration initiale de 10 mM, soit 2,5mM chacun) ; 2 unités de Taq Polymérase clonée (Perkin-Elmer/Roche MS) pour 40 cycles, une seule unité pour 25 cycles ; pour un volume final de 50µl.

Deux couples d'amorces ont été utilisés.

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont :

- 1°) - pour le premier couple :
 5'CTGCTGACGGAGAAGAAAAAC-3' / 5'CCCGCTCAGAAGAACTCGTC-3'
 ; 2°) - pour le second couple :
 5'GACGAGTTCTTCTGAGCGGG-3' / 5'GATCTGAACCTCTATTCTTG-3'

La taille des séquences amplifiées est pour le premier couple, Fin-gag/deux tiers proximaux gène NéoR : 900 pb ; et pour le second couple, tiers distal gène NéoR/ moitié proximale du LTR 3': 610 pb.

Dénaturation 5 min à 94°C ; 40 cycles sur GeneAmpPCR 9600 avec dénaturation 30" à 94°C ;

annealing 15" à 55°C et élongation 30" à 72°C ; suivis d'une étape terminale d'élongation de 10 min.

Les échantillons (15ul sur 50ul) ont été déposés sur gel d'agarose à 1,2% (Seakem, FMC) et ont été soumis à une électrophorèse horizontale de 45 min à 80 volts ; la détection du signal reposant sur l'analyse de l'intensité de fluorescence en bromure d'éthidium (BET).

6- Détermination des titres infectieux

Chacun des clones ayant été testé pour sa capacité à infecter des NIH3T3 a été amplifié et éventuellement congelé dans l'attente de l'analyse par PCR de l'efficacité d'infection.

Après PCR deux clones principaux ont été retenus et amplifiés afin d'infecter des NIH3T3 selon une procédure standard.

1ml de surnageant de culture de 16 heures sur une boîte de 35mm de diamètre de chaque clone producteur a été prélevé à confluence, filtré sur 0,45um afin d'éliminer les cellules productrices en suspension. Le surnageant a été mis en contact avec les cellules NIH3T3 à 50% de confluence sur une boîte de culture de même diamètre (35mm), en présence de polybrène à la concentration de 8ug/ml de milieu. Les cellules ont été incubées pendant 2H30 environ, à 37°C ; une agitation a été pratiquée chaque demi-heure. Trois volumes de milieu frais ont été ajoutés après 2H30.

TITRES INFECTIEUX VIRAUX

Des dilutions successives du surnageant primaire ont été utilisées pour infecter des cellules NIH3T3 ; surnageant pur, dilué au 1/10ème, au 1/1000ème et au 1/100 000ème. Deux jours après l'infection, les

cellules ont été trypsinées passées au 1/20ème environ sur trois boîtes de culture de 100 mm de diamètre et mises sous sélection par addition de Généticine (1mg/ml) au surnageant.

SOUTHERN BLOT

Deux jours après l'infection par du surnageant pur, les NIH3T3 ont été trypsinées, passées au 1/20ème environ sur trois boîtes de culture de 100 mm de diamètre, dont l'une est mise sous sélection par la généticine.

A confluence, l'ADN génomique des cellules infectées par chacun des deux clones après ou sans sélection, est extrait puis quantifié.

L'ADN a été digéré par deux enzymes de restriction, PstI et KpnI afin de réaliser un Southern blot. Après contrôle de la qualité de la digestion et homogénéisation de la quantité d'ADN déposée dans chaque puits, le transfert a été réalisé sur une membrane de Nylon Hybond N (Amersham). L'hybridation a été conduite avec une sonde incluant la totalité des séquences du LTR viral encadrées par 100 bases en amont et 100 bases en aval. La sonde a été marquée par extension d'amorce (Feinberg et Vogelstein, 1983, 1984) avec du dCTP marqué à l'alpha-32-P, à une activité spécifique de 5.10^8 cpm/ μ g.

L'hybridation a été pratiquée dans un milieu constitué de : 50% formamide désionisée ; 5X SSEP ; 1X denhardt's ; 5% dextran sulfate et 0,2mg/ml d'ADN de saumon soniqué, pendant 20 heures à 42°C. De brefs rinçages ont été pratiqués dans une solution peu stringente 2X SSEP/0,1% SDS, 5min à température ambiante et 10 min à 65°C ; suivis d'une exposition de

3 jours sur films Kodak-XAR-5 à -80°C avec écrans amplificateurs Li-Plus (Dupont-NEN).

7- Recherche de production de virus Helper

Cette recherche a été effectuée par test de mobilisation sur lignées 3T3BAG (Danos et al, 1988 ; Danos, 1991).

Les cellules 3T3BAG ont dans un premier temps été infectées par le surnageant pur de lignées d'encapsidation infectées. Plusieurs cycles successifs d'infection de 3T3BAG vierges avec le surnageant des 3T3BAG précédemment infectées ont été pratiqués pour sensibiliser le test.

RESULTATS

1- Construction du vecteur rétro-viral FOCH29

La souche virale FB29 du virus de la leucémie murine de Friend a été isolée (Mathieu-Mahul et al., 1982) et l'ADN génomique du provirus intégré a été cloné dans pBR322 (Sitbon et al.;, 1986). Cet ADN génomique a été entièrement séquencé (Perryman et al., 1991). Le fragment génomique Clal-PvuII de 2120 pb a été sous cloné dans pBR322. Ce fragment comporte les derniers nucléotides de la séquence codant pour la p15E de l'enveloppe virale, l'intégralité du Long Terminal Repeat (ou LTR) et les 3/5 èmes des séquences gag. Il constitue la matrice de l'architecture du vecteur.

Après remplacement du site Clal par un site EcoRI, le fragment EcoRI-PvuII a été sous-cloné respectivement en EcoRI-SmaI de l'adapteur multiple de pUC19. Ce clone a, d'une part, été maintenu intact pour former l'architecture de base du vecteur incluant : le LTR d'amont ou LTR 5', le site de fixation de l'initiateur

de la transcription virale (Primer Binding Site ou PBS), la séquence d'encapsidation, les séquences gag et le segment de l'adaptateur multiple (polylinker) de pUC19 ménagé par la digestion EcoRI/SmaI ; destiné à l'insertion de gènes d'intérêt.

D'autre part, un fragment BamHI-BamHI a été dérivé, en remplaçant en amont, le site EcoRI par un site BamHI ; et en tirant profit, en aval, du site BamHI endogène du virus, situé immédiatement en aval du site donneur d'épissage. Ce fragment a été introduit dans l'armature de base, dont le site HindIII du polylinker avait été au préalable remplacé par un site BglIII, générant des extrémités cohésives avec celles générées par l'enzyme BamHI.

Le gène marqueur dérivé du Rétrotransposon Tn5, conférant une résistance à la Néomycine (NéoR), a été introduit entre les deux LTRs. Après transformation sur une souche de bactéries hypercompétentes de phénotype recombinase négatif profond, afin de prévenir des remaniements éventuels des séquences en présence, les transformants de la configuration attendue ont été sélectionnés sur la base d'une carte de restriction étendue explorant la totalité de la construction. L'un d'entre eux, baptisé pFOCH29 a ensuite été amplifié et purifié afin de disposer d'une source de matériel adéquat, destiné à la transfection de lignées auxiliaires productrices de particules virales.

2- Obtention de clones producteurs de virus défectif

Transfection de lignées d'encapsulation psi-CRIP : Le plasmide pFOCH29-Néo a été introduit dans la lignée d'encapsulation amphotrope psi-CRIP décrite par Danos et al. (1988) par transfection utilisant la précipitation

au phosphate de calcium selon la procédure standard, sans ADN carrier.

Après la mise sous sélection par la Généticine, 40 parmi les colonies apparues ont été prélevées et le surnageant de culture utilisé pour infecter des fibroblastes murins (NIH3T3). Le processus primaire de sélection d'une série de clones les plus hautement producteurs de particules virales défectives encapsidées a reposé sur l'utilisation de la technique d'amplification génique par réaction en chaîne de la polymérase. L'intégration virale est analysée par PCR sur un lysat de NIH3T3 parvenues à confluence.

Deux couples distincts d'amorces de PCR ont été utilisés : 1° un premier couple amplifiant le segment terminal des séquences gag incluses dans la construction et les deux tiers proximaux du gène de résistance à la néomycine ; 2° un second couple d'amorces amplifiant le tiers distal du gène de résistance à la Néomycine et la moitié du LTR d'aval (3').

Quatre clones ont été retenus sur la base d'un signal de PCR plus intense que les 36 autres ; la répétition de la procédure a permis de confirmer les données initiales indiquant que pour deux clones le signal se détachait de façon nettement plus intense. Ces deux clones ont été amplifiés et le surnageant de culture des cellules productrices a ensuite été utilisé pour infecter des NIH3T3 à plus large échelle dans le but d'évaluer l'efficacité de la construction en termes quantitatifs.

3- Evaluation des clones producteurs

PCR Quantitative

Une analyse par PCR semi-quantitative a été menée en utilisant le couple d'amorces amplifiant la région correspondant au tiers distal du gène NéoR jusqu'à la partie médiane du LTR d'aval (3'LTR). Pour chaque clone 1 μ g et 3 μ g d'ADN génomique extrait à partir de cellules NIH3T3 infectées par un surnageant pur après ou sans sélection par la Néomycine, ont été utilisés. Chaque test a été effectué en double (duplicate). Plusieurs dilutions du plasmide pFOCH29-Néo ont été testées en parallèle calculées de telle sorte qu'elles correspondent à 0.1, 0.5 et 1 copie du transgène pour l'équivalent de 1 μ g d'ADN génomique soit respectivement 0,115 pg, 0,575 pget 1,15 pg pour un plasmide d'une taille de 7164 pb.

La PCR a été réalisée sur 24 cycles, ce qui correspond à une phase encore exponentielle de la réaction. La lecture a été réalisée par analyse densitométrique informatisée (Cybertech) de la fluorescence au bromure d'éthidium (cf tableau).

Pour le premier clone, une différence significative a été observée entre l'intensité du signal obtenu à partir des cellules infectées sélectionnées et non sélectionnées ; plus franche sur les échantillons de 1 μ g (70% du signal par rapport au sélectionné) que sur ceux de 3 μ g pour lesquels le système de détection est saturé par l'intensité du signal.

Pour le deuxième clone, il n'existe aucune différence d'intensité du signal entre cellules sélectionnées et non-sélectionnées, ni pour les échantillons de 1 μ g, ni pour ceux de 3 μ g. Ceci suggérant qu'un pourcentage proche de 100% des cellules NIH3T3 ont pu être infectées par le surnageant pur de ce clone producteur. Le haut degré d'infectivité de ce clone était par ailleurs suspecté par l'observation

d'une absence de mortalité cellulaire lors de la mise sous sélection par la Néomycine des NIH3T3 infectées avec le surnageant de culture.

Southern Blot

L'ADN des cellules NIH3T3 infectées a été soumis à une hydrolyse avec deux enzymes de restriction : KpnI et Pst I. Selon les sondes utilisées, la taille des bandes attendue après intégration virale varie. Pour l'enzyme KpnI qui coupe à l'intérieur des LTRs et au milieu de l'adaptateur multiple de pUC19, une sonde LTR révèle un fragment de taille constante de 3610 pb et deux fragments de taille variable selon la proximité de sites KpnI génomiques endogènes à proximité du site d'intégration ; une sonde dérivée par PCR avec les amorces tiers distal NéoR/segment proximal LTR, un fragment de même taille (3610 pb) est attendu, et un seul des deux autres fragments variables d'une intégration à l'autre.

Pour l'enzyme PstI qui coupe deux fois dans la partie médiane de gag et une fois dans l'adaptateur multiple de pUC19, après intégration les fragments allumés par les deux sondes précédentes seront de taille variable ; une sonde générée par PCR à partir du second couple d'amorces allume un fragment constant de 790 bases.

Plusieurs dilutions du plasmide pFOCH29-Néo digéré par KpnI et PstI ont été adjointes sur le Southern blot ; ces dilutions correspondant respectivement à 0.1, 0.5 et 1.0 copies du plasmide pour 10 µg d'ADN génomique.

En outre, l'ADN de cellules infectées non sélectionnées après l'infection et des mêmes cellules sélectionnées par la Néomycine a été systématiquement

juxtaposé afin de quantifier l'infectivité de la construction ; les cellules ayant fait l'objet d'une sélection constituant un témoin d'infection de 100%.

Titration : Titres infectieux viraux par dilutions virales

Des dilutions successives du surnageant primaire ont été utilisées pour infecter des NIH3T3 ; surnageant pur, dilué au 1/10ème, au 1/1000ème et au 1/100 000ème. Le titre infectieux retenu correspond au nombre de colonies observées pour la dernière dilution où des colonies apparaissent que multiplie l'inverse de cette dilution.

Pour le premier clone, le titre des cellules productrices initiales est de $2 \cdot 10^6$ pfu/ml. Pour le deuxième clone, le titre est de 10^6 pfu/ml

Les deux clones producteurs ont été d'une part congelés régulièrement afin d'en conserver des passages initiaux ; et d'autre part, maintenus en culture continue sur plusieurs mois. Les titrations successives (dilutions du surnageant viral) ont permis d'identifier une baisse progressive des titres. Pour le premier clone, le titre est passé de plus de $2 \cdot 10^6$ à seulement 10^1 en l'espace de deux mois de culture continue ; cette chute drastique du titre s'est accompagnée d'une modification de la pousse des cellules en culture avec un aspect en foyer et un décollement facile. Pour le second clone, le titre est passé de plus de 10^6 à 10^5 en l'espace de deux mois de culture continue, pour diminuer jusqu'à 10^3 - 10^4 après trois mois et demi ; cette chute modérée du titre ne s'est accompagnée d'aucune modification de la morphologie ni de la pousse des cellules en culture.

4- Test activité helper sur 3T3 BAG

Cette recherche a été effectuée par test de mobilisation sur lignées 3T3BAG (Danos et al, 1988 ; Danos, 1991).

Les cellules 3T3BAG ont dans un premier temps été infectées par le surnageant pur de lignées d'encapsidation infectées. Plusieurs cycles successifs d'infection de 3T3BAG vierges avec le surnageant des 3T3BAG précédemment infectées ont été pratiqués pour sensibiliser le test, qui s'est révélé négatif. En outre, aucune colonie de cellules résistant à la Néomycine n'a pu être détectée après mise en contact de NIH3T3 vierges avec le surnageant de NIH3T3 infectées et sélectionnés par la Néomycine.

DISCUSSION

1° Construction du virus

La construction virale a été basée sur le principe de conservation des séquences critiques comme le PBS, la séquence d'encapsidation, le site donneur de splice, et aussi sur la conservation d'un long segment de gag, dont le maintien participe à la stabilisation des transcrits comme l'ont montré plusieurs auteurs (revus par McLachlin et al., 1989).

Plusieurs autres constructions dérivées du même squelette rétroviral ont été réalisées auparavant ; dont une première où le LTR3' était flanqué en amont et en aval de séquences rétrovirales plus longues et où deux adaptateurs multiples de pUC19 et pUC18 étaient en présence. De cette configuration a résulté une grande instabilité, et une infectivité modeste.

Une version similaire à celle de FOCH29 a été construite ; similaire en tous points hormis l'insertion d'une large séquence incluant le site accepteur de splice de la souche "clone 57" du virus de

Friend (Sitbon et al). Le plasmide résultant a été baptisé pFOCH29SA-Néo. L'infectivité de cette construction s'est avérée moins démonstrative qu'avec pFOCH29-Néo; Néanmoins cette différence n'a été appréciée que sur les données du screening primaire par PCR.

2° Sélection des clones producteurs

La sélection primaire des clones producteurs par la procédure décrite dans la section résultats, exploite la réaction en chaîne de la polymérase ; les conditions utilisées limitent la capacité de résolution de la méthode à un seuil qui correspond approximativement à un titre rétroviral minimal de 10⁴ pfu/ml. L'inconvénient potentiel de cette procédure est lié au caractère non véritablement quantitatif de la PCR, en particulier pour quarante cycles d'amplification ; en conséquence, il existe une probabilité non négligeable de passer à côté de clones hautement producteurs. Afin de pallier en partie à cet inconvénient, une procédure primaire de sélection basée sur deux couples d'amorces de PCR indépendants a été adoptée.

3°- Efficacité de l'infection et Stabilité du virus

L'utilisation de deux couples d'amorces de PCR générant chacun des amplimères de taille attendue, permet en outre de vérifier l'absence de remaniements grossiers du génome viral au sein des segments analysés, après intégration.

Cet élément est au mieux contrôlé par le Southern blot qui vérifie l'absence de remaniements majeurs en l'absence de bandes inadéquates de par leur nombre ou leur taille ; ainsi que l'absence d'évènement d'intégration multiples au sein de cellules dérivées

d'un même clone, qui évoquerait la présence de virus helper.

Enfin, l'absence de remaniements majeurs susceptibles d'altérer la construction est au mieux appréciée par le test fonctionnel ; démontrant l'acquisition d'un phénotype résistant à la Néomycine après intégration chromosomique du gène marqueur.

L'efficacité de l'infection a ici été appréciée sur trois paramètres essentiels : 1°) la titration virale conventionnelle qui a permis de démontrer des titres supérieurs ou égaux à 10^6 pfu/ml.

2°) le Southern blot confrontant l'intensité du signal obtenu après hybridation sur un hydrolysat de $10\mu\text{g}$ d'ADN génomique provenant de cellules infectées sans sélection et après sélection par la drogue à laquelle le produit du gène transduit confère une résistance. Si des dilutions plasmidiques calculées de manière théorique ont été adjointes, elles constituent un moins bon standard que celui immédiatement sus-mentionné. En effet, les dilutions plasmidiques sont telles qu'une imprécision mineure de manipulation peut conduire à conclure de façon erronnée à une différence significative.

L'ensemble de ces éléments, additionné d'une expérience (3°)) de PCR semi-quantitative converge pour indiquer que le surnageant non dilué du second clone infecte les fibroblastes murins avec une efficacité proche de 100%.

Cependant, une instabilité des titres a été constatée avec une perte drastique rapide pour le premier clone et une décroissance beaucoup plus progressive pour le meilleur. Ce phénomène est de constatation banale dans le maniement des cellules

productrices qui semblent, au fur et à mesure des passages successifs, perdre leurs capacités d'encapsidation initiales. La production initiale de larges quantités de cellules et leur congélation attentive permet de pallier à cet inconvénient. Néanmoins le titre doit être systématiquement contrôlé, de façon itérative.

En outre, une lignée productrice amphotrope a été choisie. Cependant la transfection initiale de cellules productrices écotropes aurait pu permettre l'infection des lignées amphotropes, éventuellement répétées de façon réciproque et itérative selon la procédure de "ping-pong" (McLachlin JR) (au moyen du surnageant filtré pour prévenir un éventuel mélange des deux types cellulaires) ; celle-ci pourrait contribuer non seulement à augmenter l'infectivité des cellules productrices résultantes, mais aussi à stabiliser les titres rétroviraux.

L'efficacité toute particulière de cette construction mérite d'être soulignée ; d'autant plus que le squelette viral de la souche FB29 du virus de Friend diffère de celui qui a été utilisé pour établir les lignées d'encapsidation. La sécurité des manipulations s'en trouve encore améliorée car les risques de recombinaisons génératrices potentielles de virus compétent pour la replication s'en trouvent encore amoindris.

L'introduction d'un gène marqueur ou de toute séquence d'ADNc sens ou antisens ou d'un fragment d'ADN génomique d'une complexité limitée (nombre d'introns limité) de taille inférieure ou égale à 7kb dont il résultera un ADNc dont les introns seront expulsés dans les cibles, peut être réalisée à partir de la technique décrite précédemment.

Dans le cas où le maintien de séquences introniques semble indispensable à l'obtention de transcrits stables, le fragment génomique d'une taille inférieure ou égale à 7 kb devra être introduit en orientation transcriptionnelle inverse par rapport à la transcription virale, au mieux en utilisant une version de la construction où le LTR(3') sera l'objet d'une délétion de la région U3 et où le fragment génomique sera mis sous la dépendance transcriptionnelle d'un promoteur et/ou d'un activateur de même orientation, afin de ne pas avoir de compétition entre les transcrits sens dépendant des LTR viraux et antisens dépendant du promoteur ajouté.

L'introduction d'une délétion de tout ou partie des séquences promotrices ou activatrices de la région U3 du LTR (3') offre des garanties de sécurité majeure après intégration du rétrovirus. Dans ce cas, l'expression du transgène devra être mise sous la dépendance d'un promoteur et/ou d'un activateur exogène à l'intérieur de la construction.

REFERENCES

- Danos O, Mulligan RC

Proc Natl Acad Sci USA 85 : 6460-64, 1988

- Danos O

Practical Molecular Virology 17-27

In Collins M, the Humana Press, Clifton, New Jersey,
1991

- French Anderson W

Human gene Therapy

Science 256 : 808-813, 1992

- Mathieu-Mahul D, Heard JM, Fichelson S, Gisselbrecht
S, Sola B, Larsen C

Virology 119 : 59-67, 1982

- McLachlin JR, Cornetta K, Eglitis MA, Anderson WF
Retroviral-mediated gene transfer

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology
38 : 91-135, 1990

- Miller AD

Human gene therapy comes of age

Nature 357 : 455-460, 1992

- Mulligan RC

The basic science of gene therapy

Science 260 : 926-931, 1993

- Perryman S, Nishio J, Chesebro B

Complete nucleotide sequence of Friend murine leukemia
virus, strain FB29

Nucl Acid Res 19 : 6950, 1991

- Sitbon M, Sola B, Evans L, Nishio J, Hayes SF,
Nathanson K, Garon CF, Chesebro B

Cell 47 : 851_859, 1986

-Sitbon M, Ellerbrok H, Pozo F, Nishio J, Hayes SF,
Evans LH, Chesebro B
J Virol 64 : 2135-40, 1990

-Sitbon M, d'Auriol L, Ellerbrok H, André C, Nishio J,
Perryman S, Pozo f, Hayes SF, Wehrly K, Tambourin P,
Galibert F, Chesebro B

Proc Natl Acad Sci USA 88 : 5932-5936, 1991

- Monsigny M. et al
médecine/sciences 9:441-9, 1993

REVENDICATIONS

1. Vecteur recombinant pour le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert d'une séquence de nucléotides exogène caractérisé en ce qu'il comprend toute séquence contenue dans le fragment ClaI-PvuII comprenant les nucléotides 7702 et 1527 de la séquence donnée à la figure 1 et comprenant l'enchaînement LTR compris entre les nucléotides 7842 et 144, le site PBS débutant au nucléotide 145, la séquence d'encapsidation comprise dans l'enchaînement de 250 nucléotides suivant la fin de la séquence LTR, ladite séquence étant capable de contrôler le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert de la séquence exogène, quelle que soit son orientation transcriptionnelle par rapport à l'orientation ou transcriptionnelle du virus.

2. Vecteur recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre tout ou partie de la séquence gag située entre les nucléotides 619 et 2245 de la séquence de la figure 5, en particulier la séquence comprise entre les nucléotides 619 et 1527 de la séquence de la figure 1.

3. Vecteur recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend le fragment ClaI-PvuII comprenant les nucléotides 7702 à 1527 de la séquence représentée à la figure 1.

4. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en outre toute séquence contenue dans le fragment BamHI-BamHI comprenant les nucléotides 7702 à 310 de la séquence représentée à la figure 1, et comprenant l'enchaînement LTR compris entre les nucléotides 7842 et 144, le site PBS débutant au nucléotide 145, la séquence d'encapsidation comprise dans l'enchaînement de 250 nucléotides suivant la fin de la séquence LTR,

ladite séquence étant capable de contrôler le clonage et/ou l'expression et/ou le transfert de la séquence exogène, quelle que soit son orientation transcriptionnelle par rapport à l'orientation ou transcriptionnelle du virus.

5. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre le fragment BamHI-BamHI comprenant les nucléotides 7702 à 310 de la séquence représentée à la figure 1.

6. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins un adaptateur multiple présentant des sites de restriction uniques par rapport aux sites contenus dans le vecteur.

7. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide FOCH29 déposé à la CNCM le 30 Juin 1993 sous le n° I-1326.

8. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un gène ou une partie d'un gène marqueur, par exemple, le gène de résistance à la néomycine.

9. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la région U3 du LTR est déletée au moins en partie, de façon telle que le promoteur et/ou l'activateur contenu(s) dans U3 est (sont) au moins en partie inactivé(s) ou modifié(s).

10. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la région U5 du LTR est déletée au moins en partie.

11. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la séquence contenue dans le fragment ClaI-PvuII et/ou ce fragment,

et/ou la séquence contenue dans le fragment BamHI-BamHI et/ou ce fragment est remplacée par une séquence hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence correspondante des susdits fragments, ou est remplacée par une séquence ayant une homologie d'au moins 95% en nucléotides avec la séquence correspondante des susdits fragments ou d'au moins 85% s'agissant de la séquence U3.

12. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la séquence de nucléotides exogène est sous le contrôle d'un promoteur exogène.

13. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il est introduit dans une lignée d'encapsidation.

14. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est encapsidé dans une lignée psi-CRIP.

15. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est encapsidé dans une lignée psi-CRE.

16. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il contient plusieurs séquences exogènes.

17. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'au moins une séquence exogène est insérée dans une séquence LTR.

18. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la séquence exogène est une séquence d'intérêt thérapeutique.

19. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la séquence exogène code pour un antigène ou pour un déterminant antigénique.

20. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que la séquence exogène est une séquence d'ADN génomique, ou une séquence d'ADNc ou une séquence d'ARN.

21. Cellule recombinante procaryote ou eucaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

22. Cellule recombinante selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mammifère, en particulier d'une cellule humaine.

23. Cellule recombinante selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule hématopoïétique, en particulier d'un précurseur hématopoïétique.

24. Cellule recombinante selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule nerveuse, notamment neuronale ou gliale, d'un fibroblaste, d'une cellule hépatique, cutanée ou musculaire.

EcoRI

TCCAGGCTT AGTCTGACT CAAACAATACC ACCAGCTAA ACCACTAGAA TACGGGCCAC 7800
 ATA_nATAAA AGATTTTATT TAGTTTCAG AAAAAGGGG ^S_{3'}
 REFMLVCGD.ENV TTGCTTAGCC TGATAGCCGC AGTAACGCCA TTITGCCAAGG CATGGAAAAA TACCAAAACCA 7920
 AGAATAGAGA AGTTTACAGATG AAGGGGGGT ACACGAAAAC AGCTAACGTT GGGCCAAACCA 7980
 GGATATCTGC GGTGAGCAGT TTGGGGCCC GCCGGGGCC AAGAACAGAT GCTCACCGGG ^{,+J81} 8040
 GTTCGGCCCC GGCCGGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATATGGCCCA ACCCTCAAGCA 8100
 GTTTCCTTAAG ACCCATCAGA TGTTCAGG CTCCCCCAAG GACCTGAAT GACCCCTGTGC 8160
 CTATTTGAA TTAACCAATC AGCCTGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCCCTT CTGCTTCCCG 8220
 AGCTCTATAA AAGAGCTCAC AACCCCTCAC ^R_{3'}
 GCGCCAGTC TCCGATAGAC TGAGTCGCC ^S_{3'}
 GGTACCCGT GTATCCAATA AATCCTCTTG 60
 CTGTTGCAFC CGACTCGTGG TCTCGCTT CCTTGGAGG GTCTCCCTCAG AGTGATTGAC 120
 TACCCGTC TACCCGTC ^S_{3'}
 GGGGGTCTT CATTGGGG CTCGTCGGG ATCTGGAGAC CCCTGCCAG 180
 GGACCAACGA CCCACACCG GAGGTAAGC TGGCAGCAA TTGTTCTGT TCTGTCCATT 240
 GTCCTGTGTC TTTGATTGAT TTTATGCCC TGTGTCTGTA CTAGTGGCC GACTAGATTG 300

FIGURE 1a

→^{9R75} GCSA

Bam H1

GTATCTGGCG GATCCGTGGT CGAACITGACG AGTTTCGAGAC ACCCGGCCGC AACCCCTGGGA 360
 GACGCTCCAG GAACITCGGG GGCCATTTTT GTGGCCCGGC CAGACTCCAA CCATCCCGAT 420
 CGTTTGGAC TCTTTGGTGC ACCCCCTTA GAGGAGGGGT ATGTTGGTTCT GTTAGGAGAC 480
 AGAGGGCTAA AACGGTTTCC GCCCCCGTCT GAGTTTTGC TTTCGGTTTG GAACCGAAGC 540
 CGGCCGGCG GTCTTGTCTG CTGAGCATC GTTCTGTGTT GACTGTGTT GACTGTGTTT 600
 CTGTATTGT CTGAAAACAT GGGCAGGCT GTTACCAACCC CCTTAAGTT GACTTAGAC 660
 >REFMLYCGI, GAG ^{MAP} IS
 CACTGGAAGG ATGTCGAACG GACAGGCCAC AACCTGTGG TAGAGGTTAG AAAAGGGGC 720
 TGGGTTACAT TCTGCTCTGC AGAAATGCCA ACCTTCAACG TCGGATGGCC ACGAGACGGC 780
 ACTTTAACC CAGACATTAT TACACAGTT AAGATCAAGG TCTTCTCACCC TGGCCACAT 840
 GGACATCCGG ATCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGAAAG CTATAGCAAGT AGACCCCT 900
 CCCCTGGTCA GACCCTTCTG GCACCTAAA CCTCCCTCTC CTCCTCCCTC TTCAGCCCCC 960
 TCTCTCCAC CTGAACCCCC ACTCTCGACC CGGCCCAAGT CCTCCCTCTA TCCGGCTCTC 1020
 ACTTCTCCCTT TAAACACCAA ACC^{ShuT} AGGCTT CAAGTCCTC CTGATAGGG AGGACCACTC 1080

FIGURE 1b

ATTGATCTAC TCACGGAGGA CCCTCCGCCCT TACCGGGACC CAGGGCACC CTCTCCTGAC 1140
 GGGAAACGGGG ATAGGGGAGA AGTGGCCCCCT ACAGAAGGG CCCCTGACCC TTCCCCAATG 1200
 GTATCCC GCCC TGCGGGAGG AAAGAACCC CCCGTGGGG ATTCTACTAC CTCTCAGGG 1260
 P12 $\xleftarrow{\text{P}} \xrightarrow{\text{Cap 3'0}}$ TTCCCTTC GCCTGGAGG GAATGGACAG TATCAATACT GGCCATTITTC CTCTCTGAC 1320
 CTCATAACT GGAAAATAAA CAACCCCTCT TTCTCCGAGG ACCCAGCTAA ATTGACAGCT 1380
 TTGATCGAGT CGGTTCTCCT TACTCATCG CCCACTGGG ATGACTGCCA ACAGCTATA 1440
 $\xleftarrow{\text{debut}}$ FMS15 $\xleftarrow{\text{447}}$ $\xleftarrow{\text{468}}$ GGGACCCCTGC TGACGGAGA AGAAAACAGV CGAGGTGCTCC TAGAGGGCCG AAAGGGGT 1500
 CGAGGGAGG ACGGACGCC AACTCAG $\xleftarrow{\text{191}}$ $\xleftarrow{\text{Xba I}}$ $\xleftarrow{\text{Pst I}}$ $\xleftarrow{\text{Hind II}}$
 $\xleftarrow{\text{Bam H I}}$ $\xleftarrow{\text{Sal I}}$ $\xleftarrow{\text{Hinc II}}$ $\xleftarrow{\text{Sph I}}$
 $\xleftarrow{\text{Acc I}}$
 $\xleftarrow{\text{Cla I}}$
 CAGATCCAAT TCGATTAG TTCAATTGT TAAAGACAGG ATCTCAGTAG 7740
 TCCAGGCTT AGTCCTGACT CAACAATACC ACCAGCTAA ACCACTAGAA TAGGAGCCAC 7800
 Env $\xleftarrow{\text{Env}}$ $\xleftarrow{\text{AATAAATAAA}}$ AGATTATTATT TAGTTCCAG AAAAGGGGG DAATGAAAGA CCCCACCAA 7860
 REFMIVCGD.ENV<

FIGURE 1c

FIGURE 1d

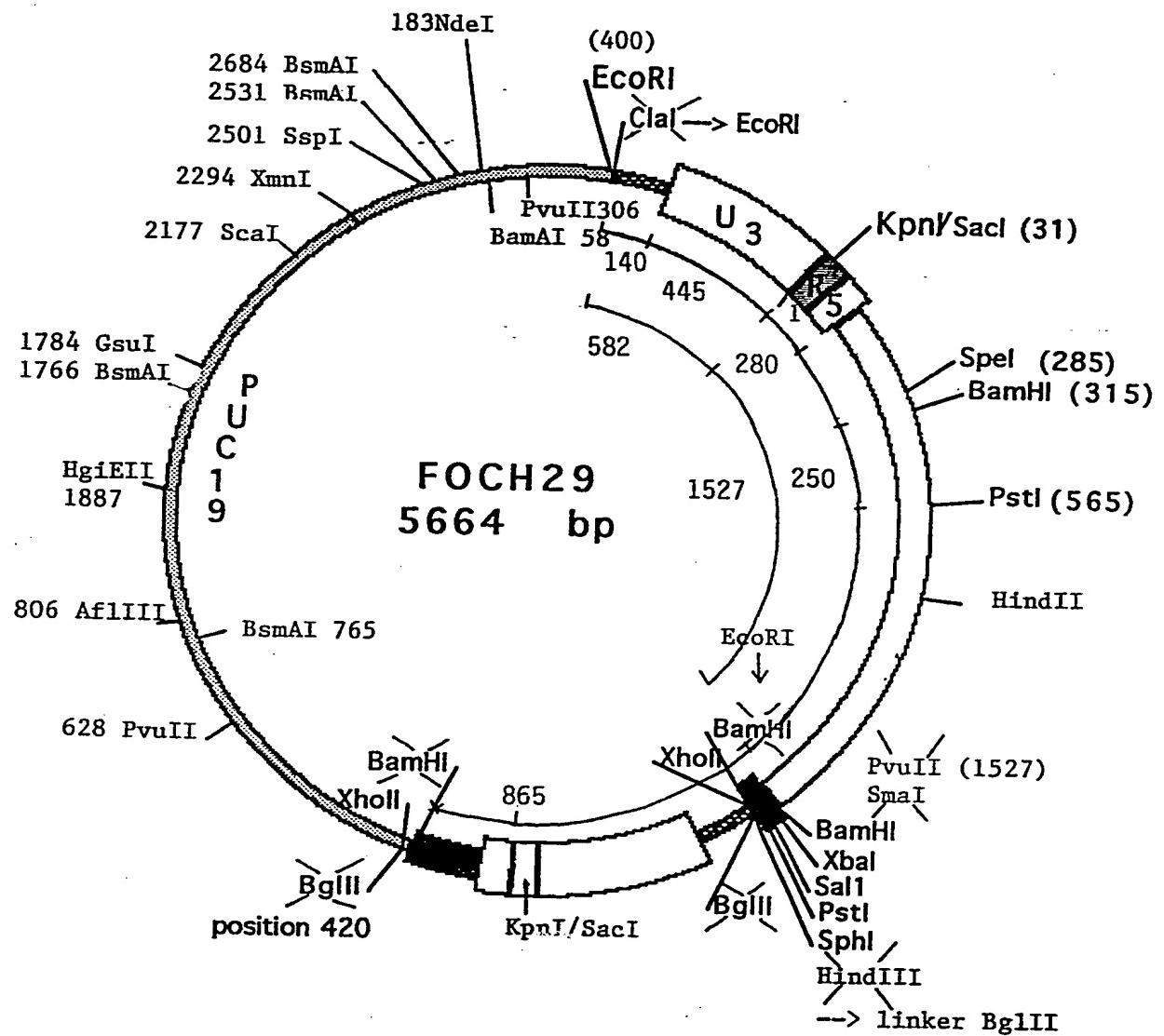


FIGURE 2

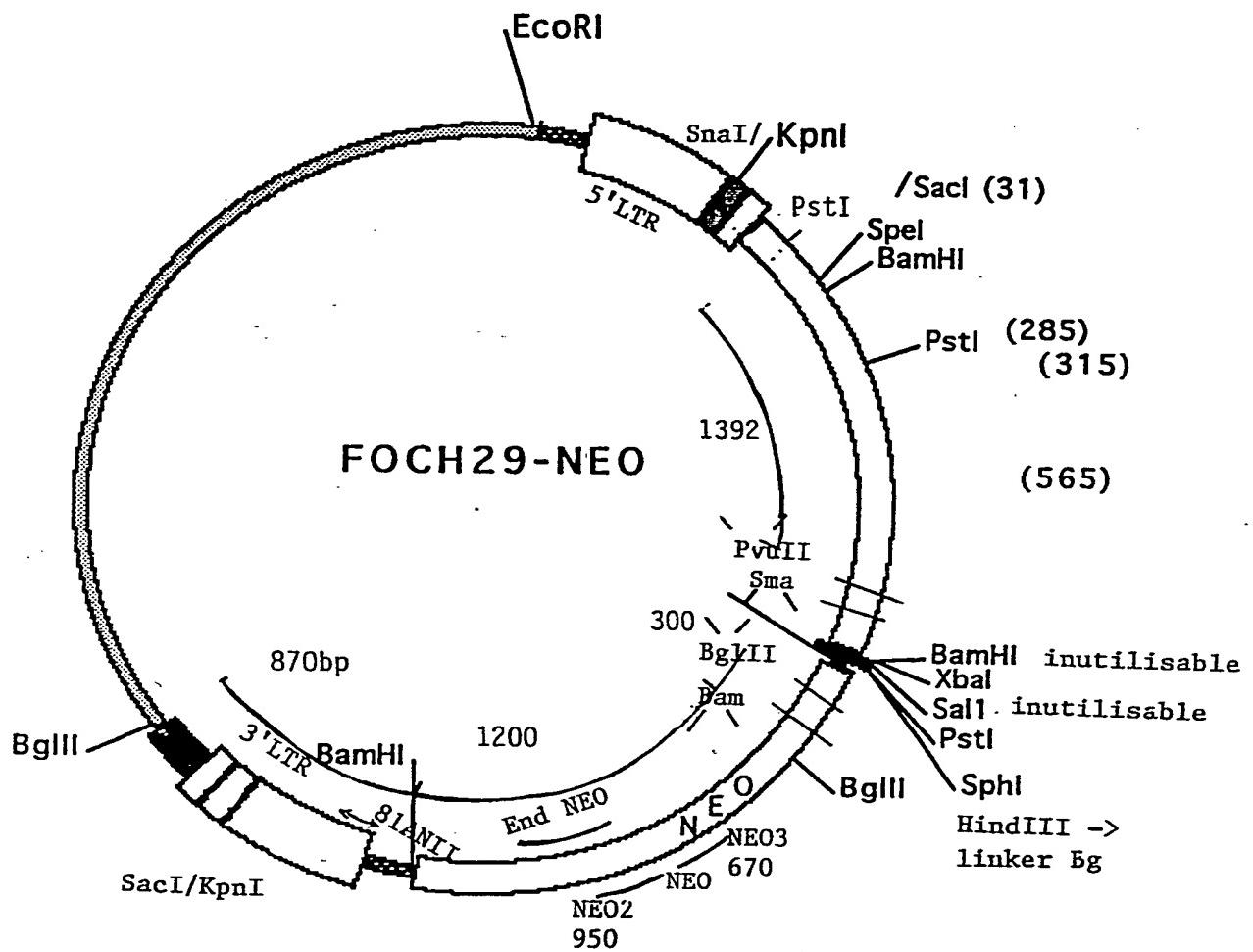
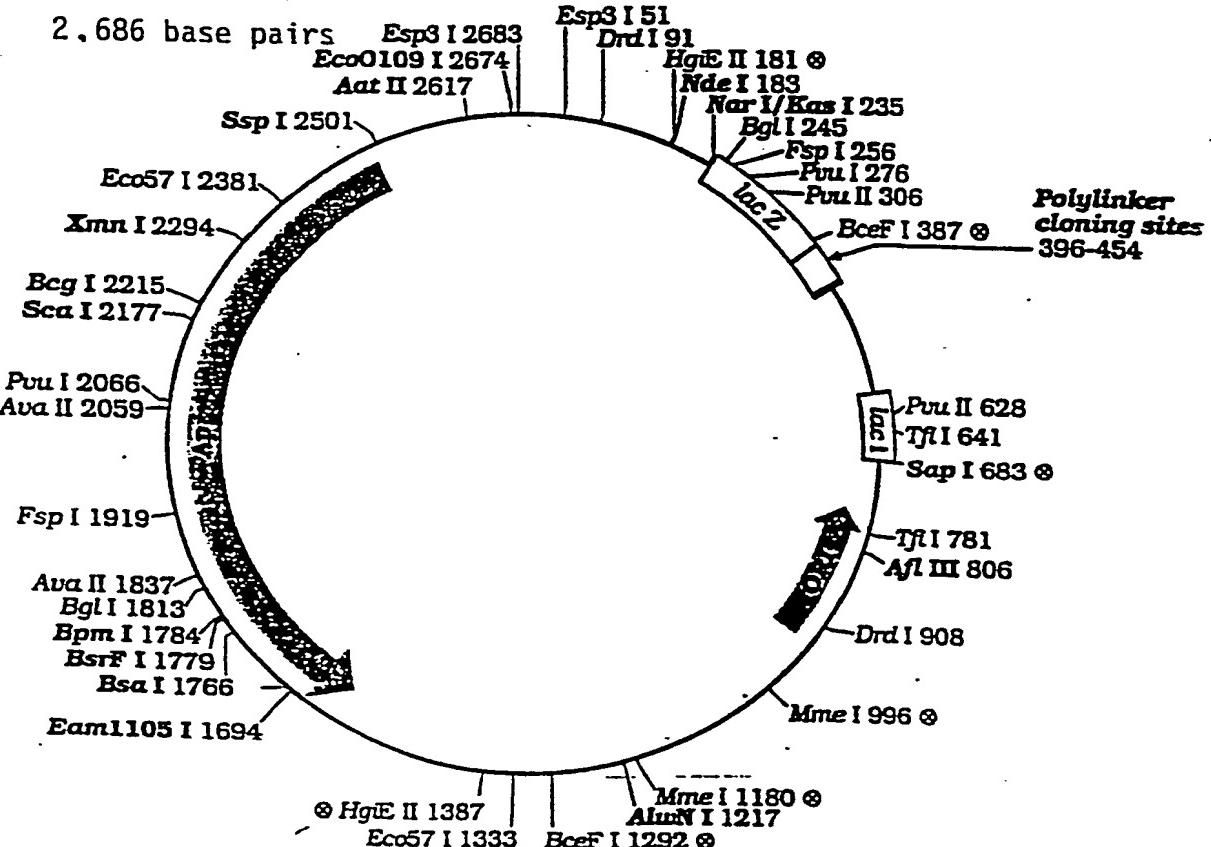


FIGURE 3

pUC19

(ATCC 37254)

2,686 base pairs



400	420	440	460
Ecl136 I Sac I	Xma I Sma I	Xba I	Pst I
EcoR I Apo I	Kpn I Acc85 I	BamH I	Sai I BlnI II Acc I
<u>Hind III</u>			
<u>BspMI</u>			

Sequence: agtgaatt~~CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGcgtaatcatggta~~

LacZ'—Ala Leu Ser Asn Ser Ser Pro Val Arg Pro Asp Glu Leu Thr Ser Arg Cys Ala His Leu Ser Pro Thr Ile Met Thr

References

1. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119.
2. Genbank Accession # VB0026 (Vecbase:pUC19c).

FIGURE 4

R
 GCGCCAGTCC TCCGATAGAC TGAGTCGCC GGGTACCCGT GTATCCAATA AATCCTCTTG 60
 U5 SmaI KpnI
 CTGTTGCATC CGACTCGTGG TCTCGCTGTT CCTTGGGAGG GTCTCCTCAG AGTGATTGAC 120
 TACCCGTCTC GGGGGTCTT CATTGGGGG CTCGTCCGGG ATCTGGAGAC CCCTGCCAG 180
 GGACCACCGA CCCACCACCG GGAGGTAAGC TGGCCAGCAA TTGTTCTGTG TCTGTCCATT 240
 GTCCTGTGTC TTTGATTGAT TTTATGCGCC TGTGTCTGTA CTAGITGCC GACTAGATTG 300
 BamHI Pr75 GCSA
 GTATCTGGCG GATCCGTGGT GGAAC TGACG AGTCGAGAC ACCCGGCCGC AACCTGGGA 360
 GACGTCCCAG GGACTTCGGG GCCATTGTT GTGGCCCGC CAGAGTCCAA CCATCCCGAT 420
 CGTTTGGAC TCTTGGTGC ACCCCCCCTTA GAGGAGGGT ATGTGGTTCT GGTAGGAGAC 480
 AGAGGGCTAA AACGGTTCC GCCCCCGTCT GAGTTTTGC TTTCGGTTG GAACCGAAC 540
 CGCGCCGCCGC GTCTTGTCTG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTT GACTGTTTT 600
 PstI gag CTGTATTGAT CTGAAAACAT GGGCCAGGCT GTTACCAACCC CCTTAAGTTT GACTTTAGAC 660
 >REFMLVCGD.GAG Map15
 CACTGGAAGG ATGTCGAACG GACAGCCCAC AACCTGTCGG TAGAGGTTAG AAAAAGGCC 720
 TGGGTTACAT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTCAACG TCGGATGGCC ACGAGACGGC 780
 ACTTTAACCC CAGACATTAT TACACAGGTT AAGATCAAGG TCTTCTCACC TGGCCACAT 840
 GGACATCCGG ATCAGGTCCC CTACATCGT ACCTGGGAAG CTATAGCAGT AGACCCCCCT 900
 CCCTGGGTCA GACCCTTCGT GCACCCCTAA CCTCCCTCT CTCTTCCCCC TTCAGCCCCC 960
 TCTCTCCAC CTGAACCCCCC ACTCTCGACC CCGCCCGAGT CCTCCCTCTA TCCGGCTCTC 1020
 StuI Map15 pp12
 ACTTCTCCTT TAAACACCAA ACCTAGGCCT CAAGTCCTTC CTGATAGCGG AGGACCACTC 1080
 ATTGATCTAC TCACGGAGGA CCCTCCGCCT TACCGGGACC CAGGGCCACC CTCTCCTGAC 1140
 GGGAACGGCG ATAGCGGAGA AGTGGCCCT ACAGAAGGAG CCCCTGACCC TTCCCCAATG 1200
 GTATCCCCGCC TGCGGGGAAG AAAAGAACCC CCCGTGGCGG ATTCTACTAC CTCTCAGGCG 1260
 p12 ← → Cap30
 TTCCCCCTTC GCCTGGGAGG GAATGGACAG TATCAATACT GGCCATTTC CTCCCTGAC 1320
 CTCTATAACT GGAAAAATAA CAACCTCTT TTCTCCGAGG ACCCAGCTAA ATTGACAGCT 1380
 TTGATCGAGT CCGTTCTCCT TACTCATCAG CCCACTTGGG ATGACTGCCA ACAGCTATTA 1440
 début FMS15 1447-1468
 GGGACCCCTGC TGACGGGAGA AGAAAAACAG CGAGTGCCTC TAGAGGCCCG AAAGGCGGTT 1500
 PvU I
 CGAGGGGAGG ACGGACGCC AACTCAGCTG CCCAATGACA TTAATGATGC TTTTCCCTTG 1560
 (1527) N+B+
 GAACGTCCCG ACTGGGACTA CAACACCAA CGAGGTAGGA ACCACCTAGT CCACTATCGC 1620
 CAGTTGCTCC TAGCGGGTCT CCAAAACGCG GGCAGAAGCC CCACCAATT GGCAAGGTA 1680
 AAAGGGATAA CCCAGGGACC TAATGAGTCT CCCTCAGCCT TTTTAGAGAG ACTCAAGGAG 1740
 GCCTATCGCA GATACACTCC TTATGACCCCT GAGGACCCAG GGCAAGAAC CAATGTGGCC 1800

ATGTCATC A TCTGGCAGTC CGCCCCGGAT ATCGGGCGAA AGTTAGAGCG GTTAGAAGAT 1860
 TTGAAGAGTA AGACCTT TAGG AGACTTAGTG AGGGAAGCTG AAAAGATCTT TAATAAACGA 1920
 GAAACCCCGG AAGAAAGAGA GGAACGTATT AGGAGAGAAA CAGAGGAAAA GGAAGAACGC 1980
 CGTAGGGCAG AGGATGTGCA GAGAGAGAAG GAGAGGGACC GCAGAAGACA TAGAGAAATG 2040
 CAp30 ←→ NCp10
 AGTAAGTTGC TGGCTACTGT CGTTAGCGGG CAGAGACAGG ATAGACAGGG AGGAGAGCGA 2100
 AGGAGGCCCG AACTCGACCA CGACCAGTGT GCCTACTGCA AAGAAAAGGG ACATTGGGCT 2160
 AGAGATTGCC CCAAGAAGGCC AAGAGGACCC CGGGGACCAC GACCCCAGGC CTCCCTCCTG 2220
 gag ←→ pol
 ACCTTAGACG ATTAGGGAGG TCAGGGTCAG GAGCCCCCCC CTGAACCCAG GATAACCCCTC 2280
 >REFMLVCGD.POL
 REFMLVCGD.GAGC
 AGAGTCGGGG GGCAACCCGT CACCTTCCTA GTGGATACTG GGGCCCAACA CTCCGTGCTG 2340
 ACCCAAAATC CTGGACCCCT AAGTGACAAG TCTGCCTGGG TCCAAGGGGC TACTGGAGGG 2400
 AAGCGGTATC GCTGGACCAC GGATCGCCGA GTGCACCTAG CCACCGGTAA GGTACCCCAT 2460
 TCTTCCTCC ATGTACCAGA TTGCCCCTAT CCTCTGCTAG GAAGAGATT GCTGACTAAA 2520
 CTAAAAGCCC AAATTCACTT TGAGGGATCA GGAGCTCAGG TTGTGGGACC AATGGGACAG 2580
 PR ←→ RT
 CCCCTGCAAG TGCTGACCCCT AAACATAGAA GATGAGTATC GGCTACATGA GACCTCAAAA 2640
 GGGCCAGATG TGCCTCTAGG GTCCACATGG CTCTCTGATT TTCCCCAGGC CTGGGCAGAA 2700
 ACCGGGGGCA TGGGGCTGGC CGTTGCCAA GCTCCTCTGA TCA~~T~~ACACTCT GAAGGCAACC 2760
 TCTACCCCCG TGTCCATAAA ACAATACCCC ATGTACAAG AAGCCAGACT GGGGATCAAG 2820
 CCCCACATAC AGAGACTGCT GGATCAGGGA ATTCTGGTAC CCTGCCAGTC CCCCTGGAAC 2880
 ACGCCCCCTGC TACCCGTTAA GAAACCGGGG ACTAATGATT ATAGGCCTGT CCAGGATCTG 2940
 AGAGAAGTCA ACAAGCGGGT GGAAGACATC CACCCCACCG TGCCCAACCC TTACAACCTC 3000
 TTGAGCGGGC TCCCACCGTC CCACCAGTGG TACACTGTGC TTGACTTAAA AGATGTTTT 3060
 TTCTGCCTGA GACTCCACCC CACCAGTCAG TCTCTCTTCG CCTTTGAGTG GAGAGATCCA 3120
 GAC~~T~~GGGAA TCTCAGGACA ATTAACCTGG ACCAGACTCC CGCAGGGTTT CAAAAACAGT 3180
 CCCACCCGT TTGATGAAGC CCTGCACAGG GACCTCGCAG ACTTCCGGAT CCAGCACCCA 3240
 GACCTGATTC TGCTCCAGTA TGTAGATGAC TTACTGCTGG CCGCCACTTC TGAGCTTGAC 3300
 TGTCAACAAG GTACCGGGC CCTGTTACAA ACCCTAGGGG ACCTCGGATA TCGGGCCTCG 3360
 GCCAAGAAAG CCCAAATTG CCAGAAACAG GTCAAGTATC TGGGGTATCT TCTAAAAGAG 3420
 GGTCAGAGAT GGCTGACTGA GGCCAGAAAA GAGACTGTGA TGGGGCAGCC TACTCCGAAG 3480
 ACCCCTCGAC AACTAAGGGA GTTCCTAGGG ACGGCAGGCT TCTGTCGCCT CTGGATCCCT 3540
 GGGTTTGCAG AAATGGCAGC CCCCTGTAC CCTCTCACCA AAACGGGGAC TCTGTTGAG 3600
 TGGGGCCAG ACCAGCAAAA GGCCTACCAA GAGATCAAGC AGGCTCTCTT AACT~~G~~CCCT 3660

GCCCTGGGAT TGCCAGACCT GACTAAGCCC TTGAACTTT TTGTTGACGA GAAGCAGGGC 3720
TACGCCAAAG GTGTCTAAC GCACAAACTG GGGCCTTGGC GTGCCCGGT GCCCTACCTG 3780
TCCAAAAAGC TAGACCCAGT GGCAAGCTGGG TGGCCCCCTT GCCTACGGAT GGTAGCAGCC 3840
ATCGCCGTTG TGACCAAAGA CGCTGGCAAG CTCACCATGG GACAGCCACT AGTCATTCTG 3900
GCCCCCCATG CAGTAGAGGC ACTAGTTAAG CAACCCCTG ATCGCTGGCT CTCCAACGCC 3960
CGAATGACCC ACTACCAGGC TCTGCTTCTG GACACGGACC GAGTCCAGTT CGGACCAATA 4020
GTGGCCCTAA ACCCAGCTAC GCTGCTCCCT CTACCTGAGG AGGGGCTGCA ACATGACTGC 4080
CTTGACATCT TGGCTGAAGC CCACGGAACT AGACCAAGATC TTACGGACCA GCCTCTCCCA 4140
GACGCTGACC ACACCTGGTA CACAGATGGG AGCAGCTTCC TGCAAGAGGG GCAGCGCAAG 4200
GCCGGAGCAG CAGTAACCAC CGAGACCGAG GTAGTCTGGG CCAAAGCACT GCCAGCCGGG 4260
ACATCGGCCA AAAGAGCTGA GTTGATAGCG CTCACCCAAG CCTTAAAAT GGCAGAAGGT 4320
AAGAAGCTGA ATGTTTACAC CGATAGCCGT TATGCTTTG CCACTGCCA TATTACCGGA 4380
GAAATATATA GAAGGCGCGG GTTGCTCACA TCAGAAGGAA AAGAAATCAA AAATAAGGAC 4440
GAGATCTTGG CCCTACTGAA GGCTCTCTTC CTGCCAAAA GACTTAGCAT AATTCAATTGC 4500
CCGGGACATC AGAAGGGAAA CCGCGCGGAG GCAAGGGCA ACAGGATGGC CGACCAAGCG 4560
GCCCGAGAAG TAGCCACTAG AGAAACTCCA GAGACTTCCA CACTTCTGAT AGAAAATTCA 4620
GCCCTCTATA CTCATGAACA TTTCACTAT ACGGTGACTG ACATAAAAGA TCTGACTAAA 4680
CTAGGGGCCA CTTATGACGA TGCAAAGAAG TGTTGGTTT ATCAGGGAAA GCCTGTAATG 4740
CCTGATCAAT TCACCTTGA ACTATTAGAT TTTCTTCATC AATTGACCCA CCTCAGTTTC 4800
TCAAAAACAA AGGCTCTTCT AGAAAGGAAC TACTGTCCTT ATTACATGCT GAACCGGGAT 4860
CGAACGCTCA AAGACATCAC TGAGACTTGC CAAGCCTGTG CACAGGTCAA TGCCAGCAAG 4920
TCTGCCGTCA AACAAAGGGAC TAGAGTTCGA GGGCACCGAC CCGGCACCCA CTGGGAAATT 4980
GATTTCACTG AGGTAAAACC TGGCCTGTAT GGGTATAAAAT ATCTTTAGT TTTCATAGAC 5040
ACTTTCTCTG GATGGGTAGA AGCTTCTCCA ACCAAGAAAG AAACTGCCAA AGTTGTAACC 5100
AAGAAGCTAC TAGAAGAAAT CTTCCCCAGA TTCGGCATGC CACAGGTATT GGGAACCGAC 5160
AATGGGCCCTG CCTTCGTCTC CAAGGTAAGT CAGACAGTAG CCGATTTACT GGGGGTTGAT 5220
TGGAAACTAC ATTGTGCTTA CAGACCCAG AGTCAGGTC AGGTAGAAAG AATGAATAGG 5280
ACAATCAAGG AGACTTTAAC TAAATTGACG CTTGCAACTG GCTCTAGGGA CTGGGTGCTC 5340
CTGCTTCCCC TAGCCCTGTA TCGAGCCCGC AACACGCCGG GCCCCCCATGG TCTCACCCCA 5400

TATGAAATCT TATATGGGGC ACCCCCAGCCC CTTGTAAACT TCCCTGATCC TGACATGGCA 5460
AAGGTTACTC ATAACCCCTC TCTCCAAGGC CATTACAGG CACTCTACCT GGTCCAGCAC 5520
GAAGTCTGGA GACC GTTGGC GGCAGCTTAC CAAGAACAAAC TGGACCGGCC GGTAGTGCCT 5580
CACCC TTCC GAGTCGGTGA CACAGTGTGG GTCCGCAGAC ACCAAACTAA AAATCTAGAA 5640
CCCCGCTGGA AAGGACCTTA TACCGTCCTA CTGACTACCC CCACCGCTCT CAAAGTGGAC 5700
GGCATTGCAG CGTGGATCCA CGCTGCCAC GTAAAGGCTG CCGACACCAG GATTGAGCCA 5760

CCATCGGAAT CGACATGGCG TGTTCAACGC TCTCAAATC CCCTAAAGAT AAGATTGACC 5820
>REFMLVCGD.ENV
CGCGGGACCT CCTAATCCCC TTAATTCTCT TCCTGTCTCT CAAAGGGGCC AGATCCGCAG 5880
REFMLVCGD.POL<
CACCCGGCTC CAGCCCTCAC CAGGTCTACA ACATTACCTG GGAAGTGACC AATGGGGATC 5940
GGGAGACAGT ATGGGAATA TCAGGCAACC ACCCTCTGTG GACTTGGTGG CCAGTCCTCA 6000
CCCCAGATT GTGTATGTTA GCTCTCAGTG GGCGCCCCA CTGGGGGCTA GAGTATCAGG 6060
CCCCCTATTC CTCGCCCCCG GGGCCCCCTT GTTGCTCAGG GAGCAGCGGG AACGTTGCAG 6120
GCTGTGCCAG AGACTGCAAC GAGCCCTTGA CCTCCCTCAC CCCTCGGTGC AACACTGCCT 6180
GGAACAGACT TAAGCTGGAC CAGGTAACTC ATAAATCAAG TGAGGGATT TATGTCTGCC 6240
CCGGGTCA CA TCGCCCCCGG GAAGCCAAGT CCTGTGGGG TCCAGACTCC TTCTACTGTG 6300
CCTCTTGGGG CTGCGAGACA ACCGGTAGAG TATACTGGAA GCCCTCCTCT TCTTGGGACT 6360
ACATCACAGT AGACAACAAT CTCACCTCTA ACCAGGCTGT TCAGGTATGC AAAGACAATA 6420
AGTGGTGCAA TCCCTTGGCT ATCCGGTTA CAAACGCCGG GAAACAGGTC ACCTCATGGA 6480
CAACTGGACA CTATTGGGT CTACGTCTT ATGTCTCTGG ACAGGACCA GGGCTTACTT 6540
TCGGGATCCG ACTCAGTTAT CAAAATCTAG GACCTCGGAT CCCAATAGGA CCAAACCCCG 6600
TCCTGGCAGA CCAACTTTCG TTCCCGCTAC CTAATCCCT ACCCAAACCT GCCAAGTCTC 6660
CCCCCGCCTC TAGTTGACT CCCACATTGA TTTCCCCGTC CCCCACCTCCC ACTCAGCCCC 6720
CGCCAGCAGG AACGGGAGAC AGATTA TAAATCTAGTACA GGGAGCTTAC CAGGCACCTCA 6780
ACCTTACCAA CCCTGATAAA ACTCAAGAGT GCTGGTTATG CCTAGTGTCT GGACCCCCCT 6840
ATTACGAGGG GGTTGCCGTC CTAGGTACTT ATTCCAACCA TACCTCTGCC CCAGCTAACT 6900
GCTCCGTGGC CTCCCAACAC AAGCTGACCC TGTCCGAAGT GACTGGACGG GGACTCTGCA 6960
TAGGAACAGT CCCAAAAACT CACCAGGCC TGTGCAACAC TACCC TTAAG GCAGGCAAAG 7020
GGTCTTACTA TCTAGTTGCC CCCACAGGAA CTATGTGGC ATGTAACACT GGACTCACTC 7080
CATGCCTATC TGCCACCGTG CTTAATCGCA CCACTGACTA TTGCGTTCTC GTGGAATTAT 7140

GGCCCAGGGT CACCTACCAT CCTCCCAGTT ACGTCTATAG CCAGTTGAA AAATCCCATA 7200
GACATAAAAG AGAACCAAGTG TCCTTAACCT TGGCCTTATT ATTAGGTGGG CTAACTATGG 7260
GTGGCATCGC CGCGGGAGTA GGGACAGGAA CTACCGCCCT GGTCGCCACC CAGCAGTTTC 7320
AGCAGCTCCA TGCTGCCGTA CAAGATGATC TCAAAGAAGT CGAAAAGTCA ATTACTAAC 7380
TAGAAAAGTC TCTTACTTCG TTGTCTGAGG TTGTACTGCA GAATCGACGA GGCCTAGACC 7440
TGTGTTCCCT AAAAGAGGGA GGACTGTGTG CTGCCCTAAA AGAAGAATGT TGTTTCTATG 7500
CTGACCATAC AGGCCTAGTA AGAGATAGTA TGGCCAAATT AAGAGAGAGA CTCTCTCAGA 7560
GACAAAAACT ATTTGAGTCG AGCCAAGGAT GGTCGAAGG ATGGTTAAC AGATCCCCCT 7620
GGTTTACCAAC GTTGATATCC ACCATCATGG GGCCTCTCAT TATACTCCTA CTAATTCTGC 7680
TTTTGGACC CTGCATTCTT AATCGATTAG TTCAATTGT TAAAGACAGG ATCTCAGTAG 7740
TCCAGGCTTT AGTCCTGACT CAACAATACC ACCAGCTAAA ACCACTAGAA TACGAGCCAC 7800
AATAAATAAA AGATTTTATT TAGTTCCAG AAAAAGGGGG GAATGAAAGA CCCCACCAAA 7860
TTGCTTAGCC TGATAGCCGC AGTAACGCCA TTTGCAAGG CATGGAAAAA TACCAAACCA 7920
AGAATAGAGA AGTCAGATC AAGGGCGGGT ACACGAAAAC AGCTAACGTT GGGCCAAACA 7980
GGATATCTGC GGTGAGCAGT TTCGGCCCCG GCCCCGGGCC AAGAACAGAT GGTCACCGGG 8040
GTTCGGGCCC GGCCCGGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATATGGCCCA ACCCTCAGCA 8100
GTTTCTTAAG ACCCATCAGA TGTTTCCAGG CTCCCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC 8160
CTTATTTGAA TTAACCAATC AGCCTGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTTCCCG 8220
AGCTCTATAA AAGAGCTCAC AACCCCTCAC TCGGCGCGCC AGTCCTCCGA TAGACTGAGT 8280
CGCCCGGGTA CCCGTGTATC CAATAAATCC TCTTGCTGTT GCA 8323

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FR 9308015
FA 486798

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	GENBANK DATABASE, Bethesda, US, GenBank ACC. NO. (GBN): Z22761; S. PERRYMAN et al.: "Retroviral expression vector pSFF DNA, complete sequence" ---	1-9, 11- 13, 16- 24
Y	GENBANK DATABASE, Bethesda, US, GenBank ACC. NO. (GBN): M60088; Y.-F. YU et al.: "Synthetic plasmid p806 polylinker site." & J. Virol. vol. 64, 1990, pages 5688-5693 ---	1-5
Y	WO-A-8 911 539 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) * le document en entier * ---	1-9, 11- 13, 16- 24
A	WO-A-9 006 757 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) * page 23, lignes 1-39 * -----	24
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CIS)
		C 12 N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
02-03-1994		GURDJIAN D P M
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant	